DOI:10.11931/guihaia.gxzw202406014

地钱 *MpPP2A-A* 基因克隆及基因敲除突变体构建

刘文珍[1,2,3]，江昕桦[1,2]，张邦跃[1,2]，陈莎[1,2]，张晶晶[1,2]，李相媛[1,2]，荣朵艳[1,2,3*]
（1. 湖南工业大学 生命科学与化学学院，湖南 株洲 412007；2. 百合种质资源创新与深加工湖南省工程研究中心，湖南 株洲 412007；3. 株洲市环境微生物与植物资源利用联合实验室，湖南 株洲 412007)

摘　要：蛋白磷酸酶 2A（protein phosphatase 2A，PP2A）是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白磷酸酶，通过去磷酸化底物蛋白参与植物的生长发育等生物学过程。地钱（*Marchantia polymorpha*）是一种新兴的模式植物，具有基因组小且基因冗余性低等许多优势。为了探究 PP2A 在植物生长中的调控机制，该文以地钱为研究对象，克隆了 MpPP2A-A 亚基（MpPP2A-A）编码区全长，并利用生物信息学软件和实时荧光定量 PCR 技术对 *MpPP2A-A* 基因的组织表达情况进行了分析，同时构建了 *MpPP2A-A* 基因的敲除突变体。结果表明：（1）*MpPP2A-A* 基因编码区全长 1 761 bp，编码 586 个氨基酸，含有 3 个结构域，不具有信号肽。（2）氨基酸序列比对结果表明，PP2A-A 在植物进化过程中相对保守。（3）实时荧光定量 PCR 表明，*MpPP2A-A* 基因在顶端缺口处、叶状体、胞芽杯中的表达依次减弱。（4）通过 CRISPR/Cas9 技术成功获得了 3 个独立的突变体株系，统计发现突变体胞芽面积较野生型 *Tak*1 显著性减小，且其形态异常。研究结果表明 *MpPP2A-A* 基因在地钱胞芽的生长过程中发挥着重要作用，为今后进一步探究其调控植物生长发育的分子机制奠定了基础。

关键词：*PP2A*，地钱，基因克隆，CRISPR/Cas9，载体构建

中图分类号：Q943.2　　　　**文献标识码：**A

MpPP2A-A gene cloning and knockout mutant constructing in *Marchantia polymorpha*

LIU Wenzhen[1,2,3], JIANG Xinhua[1,2], ZHANG Bangyue[1,2], CHEN Sha[1,2], ZHANG Jingjing[1,2], LI Xiangyuan[1,2], RONG Duoyan[1,2,3*]
(1. *Hunan University of Technology*, Zhuzhou 412007, Hunan, China；2. *Hunan Engineering Research Center for Lilium Germplasm Innovation and Deep Processing*, Zhuzhou 412007, Hunan, China；3. *Zhuzhou City Joint Laboratory for Environmental Microbiology and Plant Resource Utilization*, Zhuzhou 412007, Hunan, China)

Abstract： Protein phosphatase 2A, a serine-threonine protein phosphatase, participates in many biological processes such as plant growth and development by dephosphorylating its substrate proteins. *Marchantia polymorpha* is an emerging model plant with many advantages such as a small genome and low gene redundancy. To explore the regulatory mechanism of *PP2A-A* pattern gene in plant growth, the full-length coding region of the MpPP2A A subunit (MpPP2A-A) was cloned, and its expression was analyzed by using bioinformatics software and real-time fluorescent quantitative PCR technology. At the same time, a knockout mutant of *MpPP2A-A* gene was constructed. The results were as follows: (1) The full-length coding region of the *MpPP2A-A* gene is 1 761 bp, encoding 586 amino acids. It contains three domains and does not have a signal peptide. (2) The amino acid sequence alignment analysis indicates that PP2A-A is relatively conserved during plant evolution. (3) Real-time fluorescent quantitative PCR shows that the expression of *MpPP2A-A* gene in the apical notch, thallus, and gemma cup decreases successively. (4) Three independent mutant lines were successfully obtained by CRISPR/Cas9 technology. It was found that the area of the mutant gemma was significantly reduced compared with wild-type *Tak*1, and its morphology was abnormal. The research results show that *MpPP2A-A* gene plays an important role in the growth process of *M. polymorpha* gemma, laying a foundation for further exploring the molecular mechanism of *PP2A-A* gene regulating plant growth and development in the future.

Key words: *PP2A*, *Marchantia polymorpha*, gene cloning, CRISPR/Cas9, vector construction

---

基金项目：国家自然科学基金青年项目（32100576）；湖南省自然科学基金优秀青年项目（2024JJ4018）；湖南省教育厅优秀青年基金项目（23B0541）。

第一作者：刘文珍 (2000—)，硕士研究生，主要研究方向为以地钱为对象研究植物基因功能，（E-mail）2311478412@qq.com。

*__通信作者：__荣朵艳，博士，副教授，研究方向为以拟南芥、地钱为对象研究植物基因功能及信号调控网络，以及利用分子生物学技术方法培育百合新品种，（E-mail）rongduoyan@163.com。

蛋白质的磷酸化和去磷酸化修饰在细胞信号转导中起着至关重要的作用。长期以来，研究者们主要聚焦于蛋白蛋白激酶在磷酸化修饰中的作用，而对去磷酸化修饰的研究甚少。蛋白磷酸酶 2A（protein phosphatase 2A, PP2A）作为一种高度保守且功能多样的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶，由大量寡聚酶组成（Virshup, 2000）。在结构上，PP2A 是一种异源三聚体复合物，由支架亚基（A）、调节亚基（B）和催化亚基（C）所组成的，这种异源三聚体结构使其具有更高的灵活性和功能多样性。其中，A 和 C 亚基普遍存在，高度保守，而 B 亚基的表达模式更特异。PP2A 在植物的生长发育以及免疫调控中至关重要（Lillo et al., 2014），研究表明其参与了 ABA 响应（Punzo et al., 2018）、生长素运输（Michniewicz et al., 2007）、油菜素内酯信号传导（Tang et al., 2011）、乙烯信号传导（Zhu et al., 2021）、盐胁迫（Zhao et al., 2019）及开花（Heidari et al., 2013）等多个生理过程，特别是在激素调节、逆境反应中（Chen et al., 2014）。

目前，关于植物 PP2A 的研究主要集中在拟南芥中，已有报道表明，拟南芥有 3 个 *PP2A-A* 基因，17 个 *PP2A-B* 基因，5 个 *PP2A-C* 基因（Farkas et al., 2007）。其参与多种激素信号传导及细胞分化过程。其中，*RCN*1 基因编码的 PP2A-A 亚基在生长素运输中发挥着重要作用。*RCN*1 的缺失会导致根系卷曲、下胚轴钩形成异常、细胞长度不均、向地性反应及极向性生长素运输的缺陷（Deruère et al., 1999）。由于在拟南芥中，编码 PP2A-A 亚基的基因共有三个，基因功能冗余阻碍了我们更深入的研究，且双突变体或三突变体在种系传递中的效率较低，这显著延长了实验周期，因此目前对其具体的调控机理尚不清楚。

地钱（*Marcantia polymorpha*）作为陆地植物的最早分支，容易繁殖和传播，生命周期短，基因组小，约为 280 Mb 左右，并且大多数基因都是单拷贝的（Bowman et al., 2017）。近年来，地钱转化技术（Kubota et al., 2013; Tsuboyama et al., 2018）及定向基因组修饰（Sandler et al., 2023）已成熟，因此地钱已逐步成为研究植物进化、分子、细胞和发育等问题的模式植物（Naramoto et al., 2022; Bowman et al., 2022; Kohchi et al., 2021; Ishizaki et al., 2015）。相较于拟南芥，地钱具有基因冗余性较低的特点，其基因组中仅有一个 *PP2A-A* 基因——*MpPP2A-A*。因此，以地钱为材料更有利于深入研究 PP2A-A 的功能。

CRISPR/Cas9 系统是一种常用的基因编辑工具，它的出现推动了植物生物学研究和作物改良等多方面的发展。其操作简单、效率高是研究植物基因功能的重要手段（霍晋彦等，2019）。CRISPR/Cas9 通过定向切割特定的 DNA 序列，可诱导基因组的定点突变，从而揭示特定基因的功能（马兴亮和刘耀光，2015）。目前，CRISPR/Cas9 技术已在多种植物中得到应用，包括但不限于水稻（*Oryza sativa*）、小麦（*Triticum aestivum*）、高粱（*Sorghum bicolor*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、烟草（*Nicotiana tabacum*）和甜橙（*Citrus sinensis*）（曾秀英和侯学文，2015）。这表明 CRISPR/Cas9 技术在植物基因组编辑领域具有广泛的应用潜力和实际应用价值。与其他植物相比，CRISPR/Cas9 在地钱这种新兴的模式植物中研究较少，但已开发了一系列高效的 CRISPR/Cas9 地钱基因组编辑载体，这些载体能高效地进行地钱基因组编辑（Sugano et al., 2018），这为我们利用基因编辑技术来探究地钱 *MpPP2A-A* 基因的功能带来了可能性。

本研究以新兴模式植物地钱为材料，采用生物信息学、实时荧光定量 PCR 和 CRISPR/Cas9 技术等方法，探讨了以下问题：（1）MpPP2A-A 蛋白的理化性质与结构分析；（2）*MpPP2A-A* 基因系统进化关系及 PP2A-A 保守性预测分析；（3）*MpPP2A-A* 基因启动子活性预测分析；（4）*MpPP2A-A* 基因在地钱中特异性表达分析；（5）*MpPP2A-A* 基因缺失突变体的表型分析。通过对 *MpPP2A-A* 基因的初步研究，挖掘 PP2A-A 的基本功能，为进一步研究 *PP2A* 调控植物生长发育的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型雄性地钱 *Tak*1 由湖南工业大学百合种质资源创新与深加工湖南省工程研究中心提供；RNA 提取试剂盒、第一链 cDNA 合成试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；qPCR-PreMix 购自 Roche 有限责任公司；琼脂糖和核酸染料购自生工生物工程(上海)股份有限公司；Gateway™ LR Clonase™ Enzyme mix 购自赛默飞世尔科技公司(thermo fisher scientific)。

1.2 引物设计

利用 SnapGene 进行引物设计，其中 *MpPP2A* 基因的克隆引物为 MpPP2A-CDS-F/MpPP2A-CDS-R；*MpPP2A* 基因荧光定量 PCR 引物为 MpPP2A-qPCR-F/MpPP2A-qPCR-R；内参基因的引物为 MpAPT3-qPCR-F/MpAPT3-qPCR-R；敲除载体 sgRNA 的序列为 Oligo1 和 Oligo2；敲除载体阳性克隆鉴定的引物为 MpPP2A-crispr-1-F/M13R；转基因阳性苗 PCR 鉴定和测序的引物分别为 Cas9-F/ Cas9-R 以及 MpPP2A-crispr-12-jc-F/MpPP2A-crispr-12-jc-R；引物的具体序列信息见表 1。

表 1　本实验所用引物序列

Table 1 Sequences of primers for the experiment

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Sequences (5'–3')
MpPP2A-CDS-F	GCCGCCCCCTTCACCATGGCCATGGTAGACGAGCC
MpPP2A-CDS-R	GCCCTTGCTCACCATCGCGCACATGACTTGCTCG
MpPP2A-qPCR-F	CATGCAGTGGCTTGGTGATAAG
MpPP2A-qPCR-R	ACCAAATTCTTCGGCAAGCC
MpPP2A-crispr-1-F	GCACCCAGCCTCTCGCCGTTGGAGACTCTGTGTACGTTTTAGAGCTAGAA
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
MpPP2A-crispr-12-jc-F	ATGGCCATGGTAGACGAGCC
MpPP2A-crispr-12-jc-R	CTTGACCAAGGGAATGAACCAGTCG
MpAPT3-qPCR-F	CGAAAGCCCAAGAAGCTACC
MpAPT3-qPCR-R	GTACCCCCGGTTGCAATAAG
Cas9-F	CAGGCAGATCACTAAGCACGTTG
Cas9-R	AGCGAAATCCCTTCCCTTATCCC
Oligo1	GCACCCAGCCTCTCGGTACACAGAGTCTCCAACGGGTTTTAGAGCTAGAA
Oligo2	TTCTAGCTCTAAAACCCGTTGGAGACTCTGTGTACCGAGAGGCTGGGTGC

1.3 方法

1.3.1 基因克隆

雄性地钱 *Tak*1 植株在遗传上相对较为稳定，并且前人在地钱叶状体转化中主要以其为材料，因此本研究以 *Tak*1 为材料，用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取地钱总 RNA。以地钱总 RNA 为模板，使用反转录试剂盒进行反转录得到 cDNA。最后使用 Takara 公司的高保真酶进行 PCR 扩增。

1.3.2 生物信息学分析

利用 ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/）分析 MpPP2A-A 蛋白的理化性质；利用 ProtScale（https://web.expasy.org/ protscale/）分析 MpPP2A-A 蛋白的亲疏水性；利用 SOMPA（https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/ npsa_sopma.html）预测 MpPP2A-A 蛋白的二级结构；利用 Swiss model（https://swissmodel.expasy.org/）进行 MpPP2A-A 蛋白三级结构预测分析；利用 TMHMM （https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）预测 MpPP2A-A 蛋白跨膜结构域；利用 SignalP（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP）预测 MpPP2A-A 蛋白信号肽；利用 SMART（http://smart.embl.de/）预测 MpPP2A-A 蛋白功能结构域；利用 MEGA 11 构建 *MpPP2A-A* 基因核苷酸进化树；利用 PlantCARE 进行 *MpPP2A-A* 基因启动子活性分析；利用 TBtools 对启动子活性分析结果进行可视化。

1.3.3 *MpPP2A-A* 的表达量检测

以生长 20 d 左右的野生型地钱 *Tak*1 为材料，分别取其顶端缺口处、胞芽杯、叶状体 3 个部位，按照植物 RNA 提取试剂盒的说明书，提取各部位的 RNA。电泳检测 RNA 的质量及完整性，按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行反转录。因为地钱 *MpAPT*3 基因在地钱各个部位的表达量稳定，以它作为内参基因，用 Roche 荧光定量 PCR 试剂进行实时荧光定量 PCR，分析地钱不同部位 *MpPP2A-A* 基因的表达量。

1.3.4 *MpPP2A-A* 敲除突变体的构建

根据 CRISPR/Cas9 系统设计原则，通过 CRISPR 设计网站（http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/）在靠近起始密码子 ATG 位置选择打靶序列，在 *MpPP2A-A* 基因 1 号外显子上设计一条 sgRNA 序列，设计的 sgRNA 序列为 GTACACAGAGTCTCCAACGG，PAM 为 CGG，并在正义链和反义链分别添加接头，便于构建载体。靶序列为 Oligo1（5′–gcacccagcctctcgGTACACAGAGTCTCCAACGGgttttagagctagaa–3′）和 Oligo2（5′– ttctagctctaaaacCCGTTGGAGACTCTGTGTACcgagaggctgggtgc–3′），其中小写部分为接头，大写部分为目的序列。2 条 sgRNA 进行退火反应，反应体系包括 Oligo1（10 $\mu mol \cdot L^{-1}$）10 μL、Oligo2（10 $\mu mol \cdot L^{-1}$）10 μL、ddH_2O 10 μL。将配制好的体系混匀、瞬离，96 ℃反应 5 min，自然冷却至室温。

将 pMpGE-En01 质粒（入门载体）用 PstI 与 SacI 双酶切处理并回收，用南京诺唯赞生物有限公司 ClonExpress II 重组克隆试剂盒将引物退火产物与酶切后的质粒连接，并将连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞中，涂布于含卡那霉素的 LB 固体平板上，37 ℃过夜培养，挑取单克隆、通过菌落 PCR 进行验证、摇菌，送福州亚尚生物科技有限公司测序。利用 Gateway™ LR Clonase™ Enzyme mix，将测序正确的的质粒（含有 attL 位点的入门载体）与目的

载体（含有 attR 位点）进行体外重组。重组产物转化入大肠杆菌感受态细胞中，涂布于含壮观霉素的 LB 固体平板上，37 ℃过夜培养，挑取单克隆、通过菌落 PCR 进行验证、摇菌，并送福州亚尚生物科技有限公司测序。测序成功后提取质粒转入农杆菌感受态细胞中。

1.3.5 地钱转化、突变体鉴定及表型分析

取生长约 14 d 的野生型地钱 *Tak*1，将其叶状体四周切出伤口，在 22 ℃的全光照培养箱中预先培养 3 d；同时活化含有 *MpPP2A-A* 基因敲除载体的农杆菌；3d 后将农杆菌与预培养的 *Tak*1 在 22 ℃ 150 $r\cdot min^{-1}$、全光照条件下共培养 3 d。随后用无菌水清洗与农杆菌共培养的地钱，将其铺入筛选培养基（含潮霉素、头孢）中培养 3 周左右，获得转化子。

利用 CTAB 法提取转化子的 DNA，利用 Cas9-F/Cas9-R 引物通过 PCR 鉴定载体是否插入地钱基因组中，随后再利用检测引物 MpPP2A-crispr-jc-12-F/ MpPP2A-crispr-jc-12-R 扩增包含 gRNA 靶位点所在的 DNA 片段，将 PCR 产物送福州亚尚生物科技有限公司测序。测序结果运用 SnapGene 与野生型 *Tak*1 序列比对，分析基因敲除情况。

2 结果与分析

2.1 *MpPP2A-A* 的编码区全长克隆

在拟南芥中，已明确编码 PP2A-A 的基因有 3 个，即 *PP2Aa*1/*RCN*1、*PP2Aa*2 及 *PP2Aa*3，Locus 分别是 *At*1*g*25490、*At*3*g*25800 及 *At*1*g*13320。为了寻找地钱中的同源基因，我们在地钱网站（https://marchantia.info/）进行了氨基酸序列比对分析。结果显示，地钱中仅有一条相似度极高的序列，其 Locus 号为 *Mp*1*g*29120，命名为 *MpPP2A-A* 基因。另外，我们利用序列分析工具—DNAMAN，将拟南芥中的三条 *AtPP2A-A* 与地钱中的 *MpPP2A-A* 序列进行氨基酸比对，结果显示这四条氨基酸序列之间的相似度高达 91.62%（图 1），表明其功能在进化上具有一定的保守性。

为了获得地钱中 *MpPP2A-A* 基因的编码序列，本研究首先提取了 20 d 左右的地钱总 RNA（图 2：A），并进行了逆转录，获得了地钱的 cDNA。随后，基于 *MpPP2A-A* 基因的已知序列信息，设计了其 CDS 上下游引物 MpPP2A-CDS-F/ MpPP2A-CDS-R。以地钱的 cDNA 为模板，通过 PCR 扩增，获得了与预期大小相符的 DNA 片段（图 2：B）。利用无缝连接技术，我们将该目的 DNA 片段成功连接到克隆载体 pENTR 上，通过 PCR 鉴定并对阳性重组质粒进行测序。结果显示，*MpPP2A-A* 基因编码区全长 1 761 bp，编码 586 个氨基酸，与预期相符，确认该片段为 *MpPP2A-A* 基因的完整编码序列。

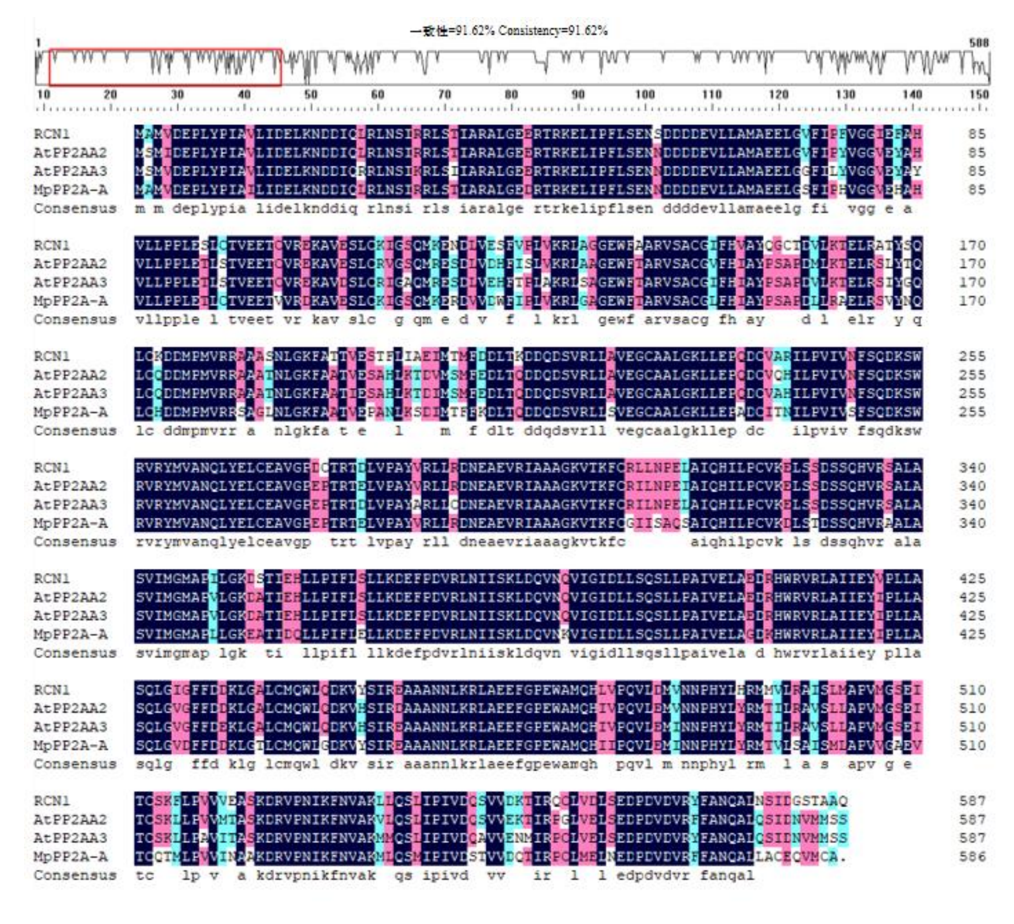
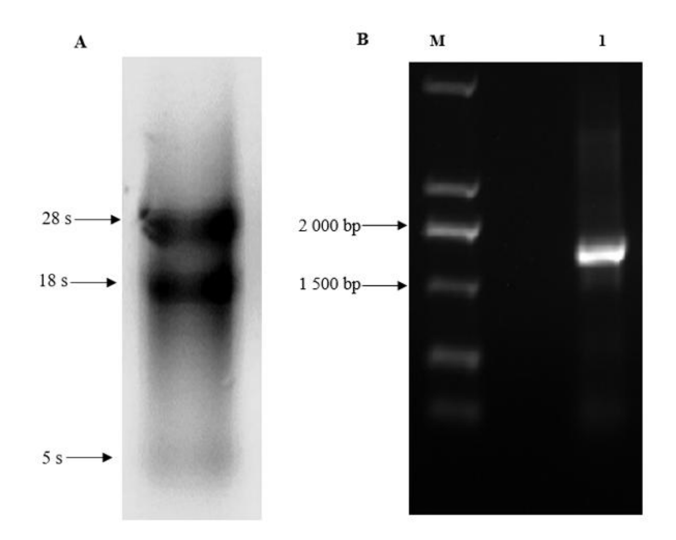


图 1 拟南芥与地钱中 PP2A-A 氨基酸序列比对结果

Fig. 1 PP2A-A amino acid sequence alignment between *Arabidopsis thaliana* and *Marchantia polymorpha*



A. 地钱 *Tak*1 总 RNA 提取电泳图；**B**. *MpPP2A-A* 基因的 CDS 序列扩增结果（**M**. DL5000 DNA Marker；**1**. *MpPP2A-A* 基因的 CDS 序列电泳结果)。

A. Total RNA extraction electrophoretogram of *Tak*1; **B**. CDS sequence amplification results of *MpPP2A-A* gene (**M**. DL5000 DNA Marker;**1**. CDS sequence electrophoretic results of *MpPP2A-A* gene).

图 2　地钱 *Tak*1 总 RNA 提取及 *MpPP2A-A* 基因扩增结果

Fig. 2　Total RNA extraction of *Tak*1 and *MpPP2A-A* gene amplification results

2.2 MpPP2A-A 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 MpPP2A-A 蛋白质的一级结构

使用 ProtParam 在线分析 MpPP2A-A 蛋白质的一级结构，其分子式为 $C_{2907}H_{4691}N_{773}O_{852}S_{34}$；等电点 PI 为 4.92，是一种酸性蛋白质；脂肪系数为 112.15，稳定系数为 38.50（稳定系数小于 40，为稳定蛋白），因此将该蛋白质归类为稳定蛋白质。预测其编码 586 个氨基酸，带负电氨基酸残基（Asp+Glu）80 个，带正电氨基酸残基（Arg+Lys）56 个；其中亮氨酸（Leu）占 12.8%，丙氨酸（Ala）和缬氨酸（Val）分别占 9.2%和 8.9%（表 2）。通过 ProtScale 在线软件分析 MpPP2A-A 蛋白亲疏水性，正值表示亲水性，负值表示疏水性，得分的绝对值大小反映了这种性质的强弱程度。结果显示 MpPP2A-A 蛋白疏水性最大值为 2.356，亲水性最大值为-3.200（图 3），这表明它的残基具有较强的疏水性，表明该蛋白可能为疏水性蛋白。

表 2 MpPP2A-A 蛋白的氨基酸组成

Table 2 The amino acid composition of the MpPP2A-A protein

氨基酸 Amino acid	数量 Quantity	比例 Proportion (%)	氨基酸 Amino acid	数量 Quantity	比例 Proportion (%)
Ala (A)	54	9.2	Lys (K)	25	4.3
Arg (R)	31	5.3	Met (M)	20	3.4
Asn (N)	21	3.6	Phe (F)	18	3.1
Asp (D)	41	7.0	Pro (P)	31	5.3
Cys (C)	14	2.4	Ser (S)	31	5.3
Gln (Q)	22	3.8	Thr (T)	21	3.6
Glu (E)	39	6.7	Trp (W)	6	1.0
Gly (G)	24	4.1	Tyr (Y)	10	1.7
His (H)	10	1.7	Val (V)	52	8.9
Ile (I)	41	7.0	Pyl (O)	0	0.0
Leu(L)	75	12.8	Sec(U)	0	0.0

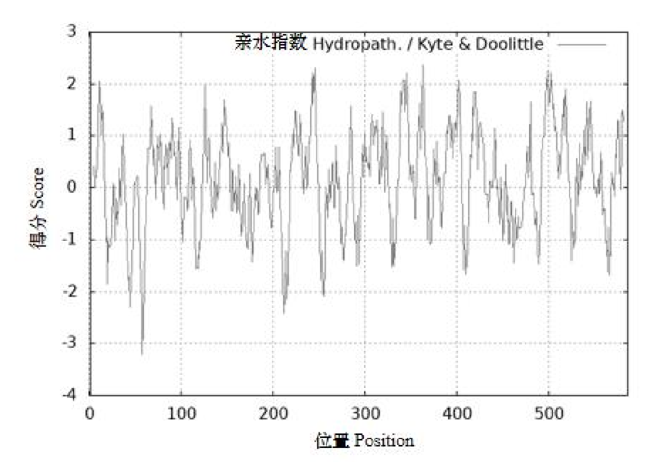
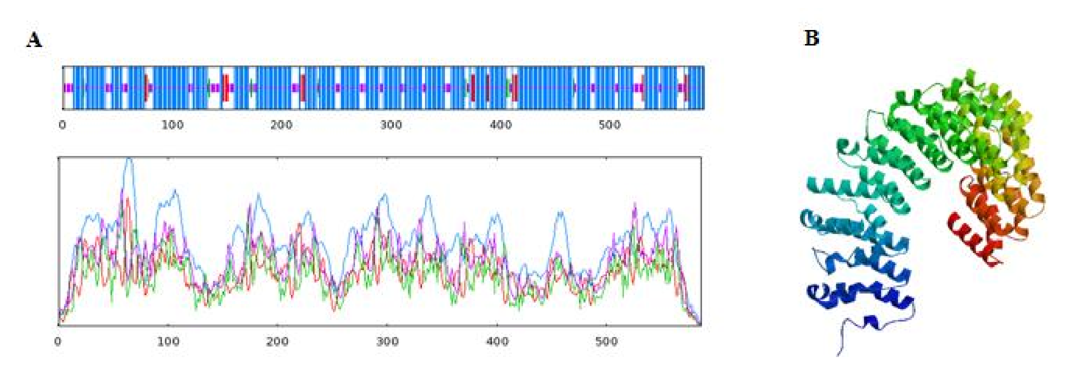


图 3　MpPP2A-A 的亲疏水性结果

Fig. 3　The hydrophilicity and hydrophobicity results of the MpPP2A-A protein

2.2.2 MpPP2A-A 蛋白的二、三级结构

使用在线软件 SOPMA 预测了 MpPP2A-A 蛋白的二级结构，在 MpPP2A-A 蛋白中所含的 586 个氨基酸中，α-螺旋占 75.60%，β-转角占 2.39%，不规则卷曲占 17.75%，延伸链占 4.27%。由图 4：A 可知，α-螺旋是蛋白质中的主要二级结构元件。利用 SWISS MODEL 对 MpPP2A-A 蛋白三级结构进行预测，结果表明它是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 2A 65 kDa 调节亚基 Aα异构体，以单体形式存在，无相应的配体小分子（图 4：B）。该结构预测结果 GMQE（全球模型质量估计）的值为 0.81，QMEGN（蛋白质统计学质量评估方法）得分为 0.80±0.05，可见模型的可信度和质量较高。



A. MpPP2A-A 蛋白的二级结构（蓝色表示α-螺旋；红色表示延伸链；绿色表示β-转角；紫色表示无规则卷曲）；**B**. MpPP2A-A 蛋白的三级结构。

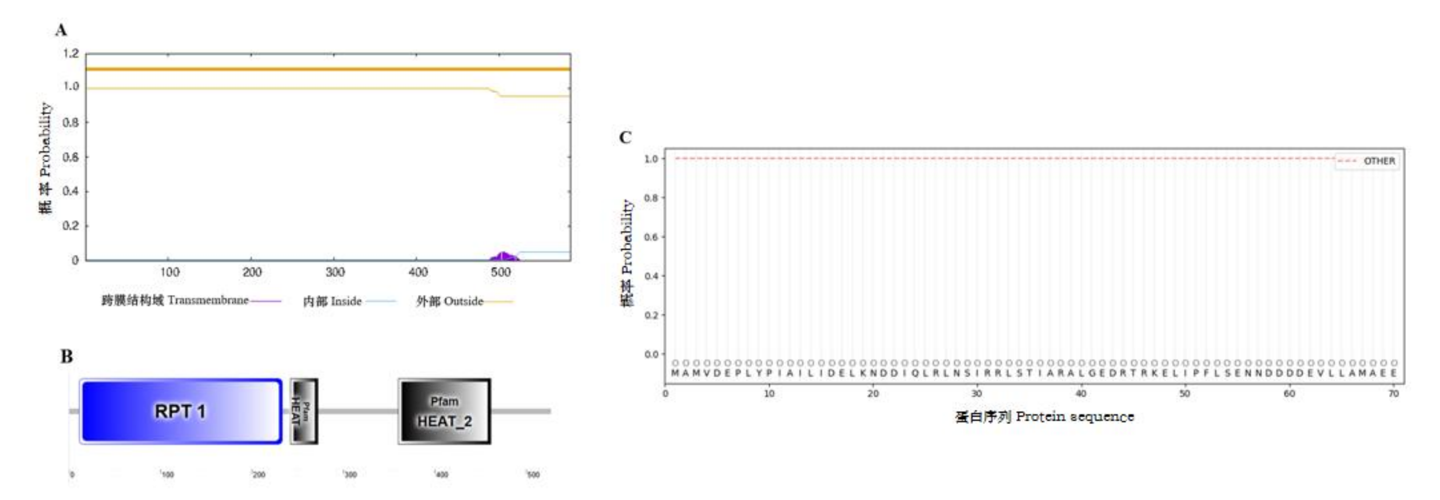
A. The secondary structure of MpPP2A-A protein(Blue indicates α-helix; Red indicates the extended chain; Green indicates β-angle; Purple indicates random coil); **B**. The tertiary structure of MpPP2A-A protein.

图 4　MpPP2A-A 蛋白的二、三级结构

Fig. 4　Secondary and tertiary structures of MpPP2A-A protein

2.2.3 MpPP2A-A 蛋白质的结构域分析

采用 TMHMM 2.0 在线分析软件对 MpPP2A-A 蛋白跨膜结构域进行分析和预测。结果显示，在蛋白序列的前 500 个氨基酸处，预测其在膜外；在第 500 个氨基酸左右时，有 90%左右的概率处在膜外且不存在跨膜结构域（图 5：A），推测其可能是分泌蛋白。采用 SMART 和 SignalP 6.0 分析其信号肽和功能结构域，结果显示该蛋白含有 3 个结构域（图 5：B），分别为 RPT1 结构域（11~233 aa）、HEAT（242~272 aa）以及 HEAT_2（360~461 aa），不具有信号肽（图 5：C）。



A. MpPP2A-A 蛋白跨膜结构预测；**B**. MpPP2A-A 蛋白功能结构域预测；**C**. MpPP2A-A 蛋白信号肽预测。

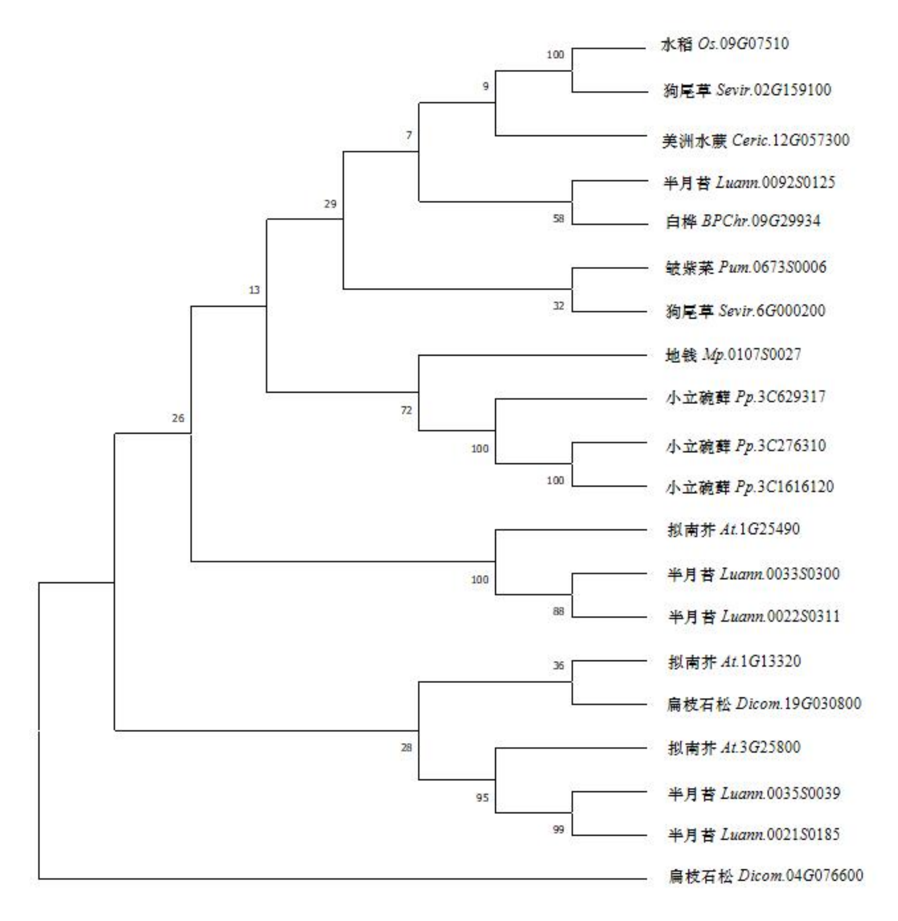
A. Prediction of MpPP2A-A protein transmembrane structure; **B**. Prediction of MpPP2A-A protein functional domain; **C**. Prediction of MpPP2A-A protein signal peptide.

图 5　MpPP2A-A 蛋白的跨膜结构和功能结构域

Fig. 5　Transmembrane structure and functional domain of MpPP2A-A protein

2.2.4 *MpPP2A-A* 基因的系统发育树

为了探究 *PP2A-A* 基因在地钱与其他物种中的亲缘关系，我们采用 NCBI BLAST 对 *MpPP2A-A* 基因的核酸序列进行同源序列比对搜索，在苔藓植物、藻类植物、蕨类植物、裸子植物、被子植物等分类类别下选取了一些代表性植物进行分析，包括拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、小立碗藓（*Physcomitrium patens*）、水稻（*Oryza sativa*）、半月苔（*Lunularia cruciata*）、美洲水蕨（*Ceratopteris richardii*）、白桦（*Betula platyphylla*）、狗尾草（*Setaria viridis*）、扁枝石松（*Diphasiastrum complanatum*）、皱紫菜（*Porphyra crispata*）。采用 MEGA 11 软件构建了 *PP2A-A* 核苷酸系统发育树(图 6)。结果显示，地钱与小立碗藓中的 3 个同源基因亲缘关系较近。另外，*MpPP2A-A* 基因与拟南芥中 *RCN*1 基因具有较高亲缘性。



Pp. 小立碗藓；***Mp***. 地钱；***Ceric***. 美洲水蕨；***AT***. 拟南芥；***Luann***. 半月苔；***BPChr***. 白桦；***Sevir***. 狗尾草；***Os***. 水稻；***Dicom***. 扁枝石松；***Pum***. 皱紫菜。

Pp. *Physcomitrium patens*; ***Mp***. *Marchantia polymorpha*; ***Ceric***. *Ceratopteris richardii*; ***AT***. *Arabidopsis thaliana*; ***Luann***. *Lunularia cruciate*; ***BPChr***. *Betula platyphylla*; ***Sevir***. *Setaria viridis*; ***Os***. *Oryza sativa*; ***Dicom***. *Diphasiastrum complanatum*; ***Pum***. *Porphyra crispata.*

图 6　地钱和其他物种 *PP2A-A* 基因的核苷酸进化分析

Fig.6　Analysis of *PP2A-A* nucleotide evolution in *Marchantia polymorpha* and other species

2.2.5 *MpPP2A-A* 基因启动子活性预测分析

使用 PlantCARE 对 *MpPP2A-A* 基因的启动子区域进行活性预测分析，我们发现该基因的启动子前 3 000 bp 序列不仅包含大量的核心启动子元件 TATA-BOX 和 CAAT-BOX，还含有一些生长素响应元件、光响应元件、茉莉酸甲酯（MeJA）响应性顺式调控元件等(图 7)。这些结果表明，*MpPP2A-A* 基因的表达可能受光、生长素和 MeJA 等多种环境因素的调控。

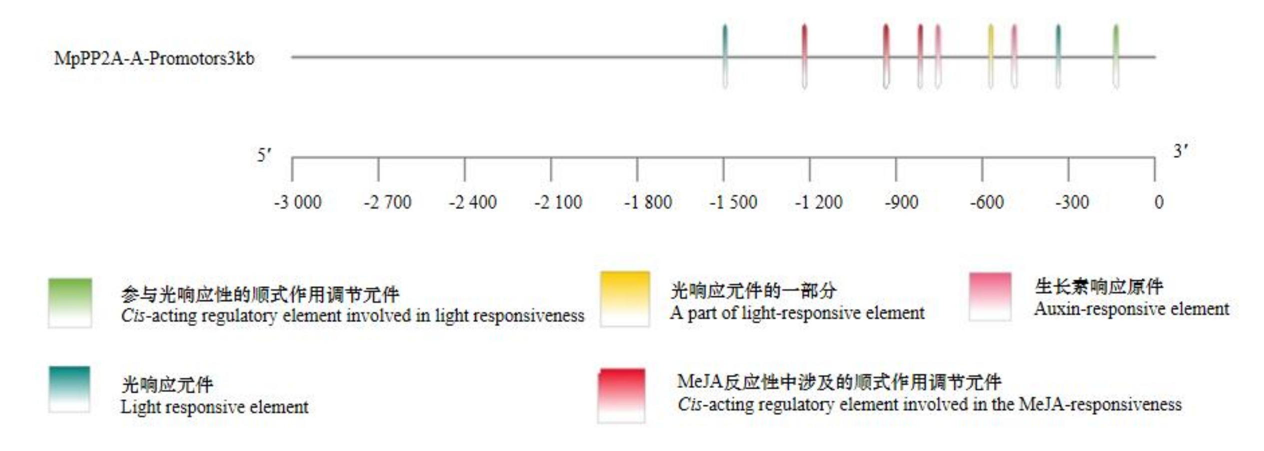
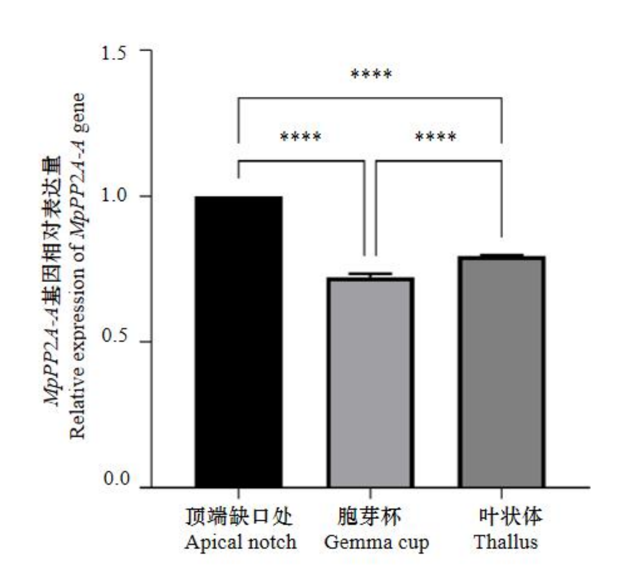


图 7　*MpPP2A-A* 基因启动子活性分析

Fig. 7　Promoter activity analysis in *MpPP2A-A* gene

2.3 *MpPP2A-A* 基因的组织特异性分析

采用实时荧光定量 PCR 进一步验证 *MpPP2A-A* 基因在地钱不同组织部位的表达水平。结果所示，*MpPP2A-A* 基因在地钱的顶端缺口、胞芽杯和叶状体中均有表达（图 8）。其中，在顶端缺口处的表达量最高，其次为叶状体，而在胞芽杯中的表达量最低。



MpPP2A-A 基因在地钱不同组织部位的表达水平，数值指的是平均值±标准误差，***表示 $P<0.001$，****表示 $P<0.0001$ (Student's t-test)。Expression levels of *MpPP2A-A* gene in different tissue parts of *Marchantia polymorpha*, values refer to the average ± standard error, *** indicates $P<0.001$, and **** indicates $P<0.0001$ (Student's t-test).

图 8　*MpPP2A-A* 基因在地钱不同组织部位中表达量的差异

Fig. 8　Differences of expression levels of *MpPP2A-A* in different tissue parts of *Marchantia polymorpha*

2.4 *MpPP2A-A* 基因敲除突变体的构建

2.4.1 sgRNA 载体构建结果

将 2 条 sgRNA Oligo 退火，形成双链后连接到 PstI 与 SacI 酶切后的 pMpGE-En01 入门载体上，转化入大肠杆

菌感受态细胞中，并挑取单克隆菌落测序，结果显示载体构建正确（图 9）。通过 LR Clonase Enzyme mix，将 sgRNA 从 pMpGE-En01（入门载体）置换入 pMpGE010 质粒（表达载体）上，转入大肠杆菌感受态细胞中挑取单克隆测序，序列正确，*MpPP2A-A* 敲除载体构建成功。

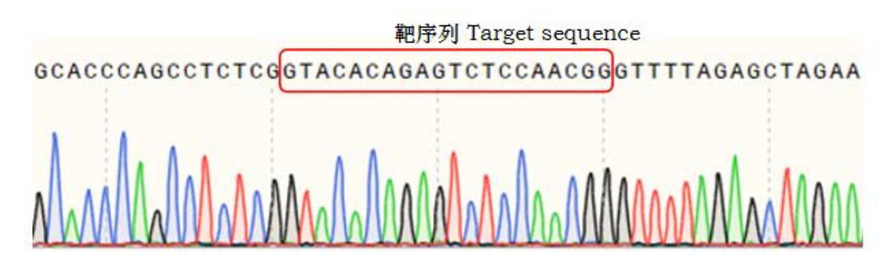


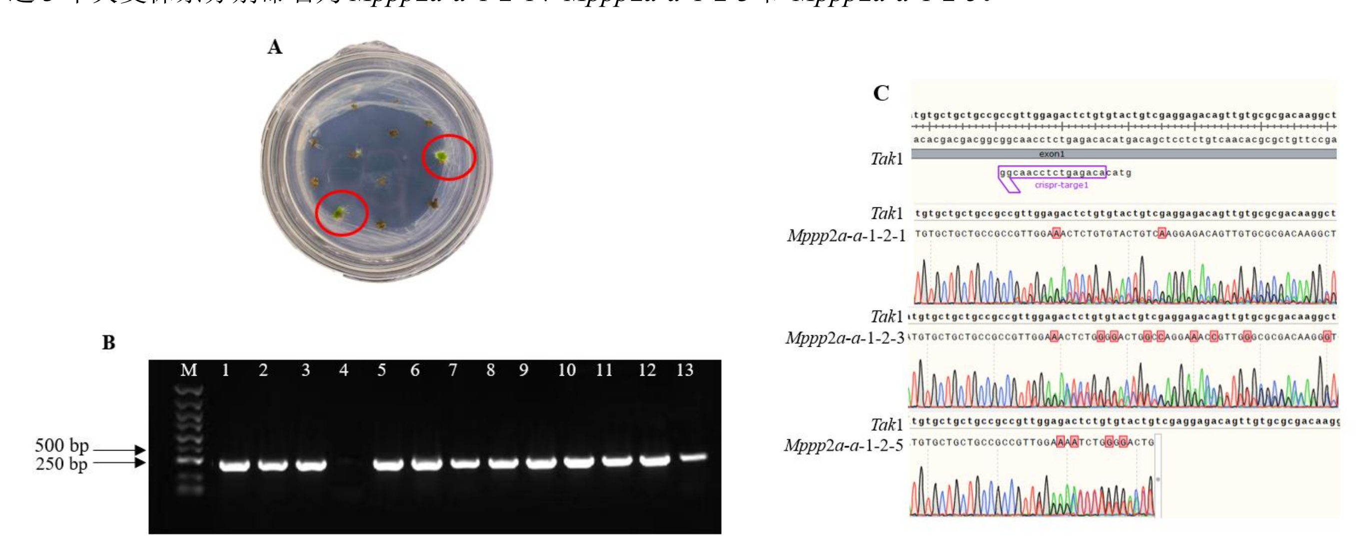
图 9　*MpPP2A-A* 基因敲除载体的测序结果

Fig.9　Construction of *MpPP2A-A* knockout sequence result

2.4.2 农杆菌转化结果及突变体的获得

将构建成功的敲除载体转入农杆菌中。接着，对地钱叶状体在全光照条件下培养 3 d，随后与活化后的农杆菌共培养 3 d（图 10：A）。

经过筛选和培养后，利用 CTAB 法分别提取 13 株转基因地钱的 DNA，并采用引物 cas9-F/cas9-R 进行 PCR 检测。琼脂糖凝胶电泳的结果显示，在预期的 450 bp 片段处有单一明亮条带（图 10：B），这表明携带 Cas9 的表达载体已成功转入地钱中。随后，使用引物 MpPP2A-crispr-12-jc-F/MpPP2A-crispr-12-jc-R 进行 PCR 扩增，并对扩增产物进行测序。测序结果显示，3 个转基因株系的靶 DNA 位点发生了突变（图 10：C），其余均为野生型。我们将这 3 个突变株系分别命名为 *Mppp2a-a*-1-2-1、*Mppp2a-a*-1-2-3 和 *Mppp2a-a*-1-2-5。



A. 筛选培养基上长出的转化子；**B**. 转化子的 PCR 鉴定结果（**M**. DL5000 DNA Marker；**1-13**. 13 个转化子鉴定结果）；**C**. 转化子靶位点序列比对峰图。

A. Transformants grown on the screening medium; **B**. PCR identification results of transformants (**M**. DL5000 DNA Marker; **1-13**. Identification results of 13 transformants); **C**. Peak map of convertor target site sequence alignment.

图 10　*MpPP2A-A* 转化子的获得以及鉴定

Fig.10　Acquisition and identification of *MpPP2A-A* transformant

2.5 *MpPP2A-A* 敲除突变体的表型分析

胞芽是地钱的无性繁殖体，能够快速增加个体数量，并且能够保持遗传稳定性；除此之外，胞芽有利于地钱能够更好地适应不同的环境条件，提高出其对严苛环境的适应能力。因此，我们进一步以野生型 *Tak*1 为对照，分析了 *Mppp2a-a* 突变体植株的胞芽生长情况。当地钱的胞芽杯充满胞芽时（约 22 d），我们分别在野生型 *Tak*1 和 3 种突变体的胞芽杯中各取 50 个胞芽进行统计，利用 Image J 测量其面积。统计结果（图 11：A），野生型 *Tak*1 的平均面积为 0.436 7 mm²，而 *Mppp2a-a*-1-2-1 的平均面积为 0.244 3 mm²，*Mppp2a-a*-1-2-3 的平均面积为 0.229 8 mm²，*Mppp2a-a*-1-2-5 的平均面积为 0.274 4 mm²。结果表明，3 个突变体株系的胞芽大小与野生型 *Tak*1 之间存在显著性差异，*Mppp2a-a* 突变体的胞芽明显缩小。另外，野生型地钱胞芽两边对生着两个顶端分生组织，形成缺口，即顶端缺口处，*Mppp2a-a* 缺失突变体顶端缺口明显增加且形态不规整（图 11：B）。这表明在地钱中 *MpPP2A-A* 基因的缺失对其正常的生长发育产生了影响。

A. *Tak*1 与突变体胞芽面积统计，数值指的是平均值±标准误差，****表示 P<0.0001(Student's t-test)；**B**. *Tak*1 与突变体表型对比，图中红色箭头指向顶端缺口处，标尺的长度为 0.25 mm。

A. *Tak*1 and mutant gemma area statistics, the values refer to the mean±standard error, **** indicates P<0.0001 (Student's t-test); **B**. Comparison of *Tak*1 and mutant phenotype, the red arrow points to the apicial notch, and the length of the ruler is 0.25 mm.

图 11　*Mppp2a-a* 突变体表型分析

Fig. 11　Morphological analysis of *Mppp2a-a* mutants

3 讨论与结论

蛋白磷酸酶 2A（PP2A）由结构亚基 A、调节亚基 B 和催化亚基 C 组成。这三个亚基的结构和功能紧密相关，共同决定了 PP2A 的活性和特异性。其中催化亚基 C 是 PP2A 的核心部分，负责催化去磷酸化反应，靶向丝氨酸或苏氨酸上的磷酸基团。C 亚基通过与 A 亚基结合形成核心酶，然后与 B 亚基结合形成完整的 PP2A 全酶（Zheng et al., 2020）。结构亚基 A 提供一个支架，使 B 和 C 亚基能够结合，从而稳定整个复合物。A 亚基在细胞内特异性 PP2A 活性的调控中起着关键作用，其编码基因突变或下调会导致多种癌症的发生，植物缺失 *PP2A-A* 会影响植物的生长发育。调节亚基 B 则决定了 PP2A 的底物特异性和功能多样性（Morita et al., 2020），B 亚基家族（如 Bα、Bβ、Bγ 等）通过不同的变体和组合，赋予 PP2A 不同的功能和定位。总之，PP2A 的三个亚基通过复杂的相互作用，形成具有高度特异性和多样性的酶复合物，在细胞内发挥多种关键生物学功能，涉及细胞增殖、凋亡、分化、迁移以及信号传导等多个方面（Seshacharyulu et al., 2013；Nader et al., 2019）。

本研究主要针对地钱中编码 PP2A 结构亚基 A 基因—*MpPP2A-A* 基因进行了预测分析。地钱与拟南芥的氨基酸序列比对结果表明，MpPP2A-A 在植物的进化上比较保守。随后，我们发现 *MpPP2A-A* 基因在地钱中的特异性表达情况为在叶状体、胞芽杯及顶端缺口处均有表达，这一结果与其他植物中 *PP2A-A* 基因的表达模式相似，例如在本氏烟草中，*PP2A* 的两个编码结构亚基基因在不同组织部位均有表达（陈孝仁等，2018）。

另外，本研究发现 *MpPP2A-A* 基因缺失后，胞芽的面积显著缩小，这一结果与拟南芥中的突变体植株矮小是一致的。根据已有报道，*PP2A-A* 基因在拟南芥中参与生长素运转途径（Garbers et al., 1999），通过去磷酸化生长素转运蛋白 PIN，改变其磷酸化状态从而影响 PIN 蛋白的分布，最终导致生长素的分布发生改变，从而影响根系的生长发育（Michniewicz et al., 2007）。最近的研究表明，PP2A-A 亚基能够直接与水杨酸（SA）结合，调控 PIN 的磷酸化状态，进而影响生长素的运输（Tan et al., 2020）。因此，本研究中地钱胞芽面积的缩小很可能与生长素的分布变化相关，后续实验将对此进行进一步验证。此外，*Mppp2a-a* 缺失突变体在早期形态上也表现出明显变化。在正常情况下，野生型 *Tak*1 中控制地钱生长的顶端缺口（apical notch）一般存在两个，且呈规则对称分布。然而，在突变体中，顶端缺口的数量通常增多且位置不对称不规则，暗示 *MpPP2A-A* 可能参与了细胞的分裂过程。

除了在植物生长发育方面的作用外，*PP2A-A* 基因在山毛榉（*Fagus sylvatica*）的研究中，还可以打破种子的休眠(González-García et al., 2006)；参与植物对光逆境的响应，调节向光及蓝光诱导的气孔开度(Tseng & Briggs, 2010)，而启动子的预测分析结果显示地钱中的 *MpPP2A-A* 也可能与光和逆境相关。在非生物胁迫方面，*RCN*1 正向调节植物对离子、渗透压和氧化应激的响应（Blakeslee et al., 2008），而玉米 *ZmPP2Aa*1 通过重构根构型改善低磷胁迫响应（Wang et al., 2017）。这些报道都显示了 PP2A-A 亚基在植物各方面的重要性，也为后续在地钱中的实验提供了方向。

综上所述，本研究从地钱基因组中筛选出编码 PP2A-A 亚基的唯一基因，成功克隆了 *MpPP2A-A* 基因，并对其

理化性质和二、三级结构进行了预测分析。系统进化树分析显示，*MpPP2A-A* 基因与拟南芥 *RCN*1 聚为一类。荧光定量 PCR 显示 *MpPP2A-A* 基因在地钱不同组织部位的表达情况以及对生长发育的影响。此外，*MpPP2A-A* 基因缺失导致地钱胞芽面积和形态发生显著变化，暗示该基因参与调控地钱胞芽生长、顶端缺口形成及对称性维持。本研究结果为进一步探索 *PP2A-A* 调控植物生长的分子机制奠定了基础，并为揭示 PP2A-A 亚基在植物中的功能提供了重要方向，也为进一步探索地钱的生长发育机制和适应环境的策略提供了新的思路。

参考文献：

BLAKESLEE JJ, ZHOU HW, HEATH JT, et al., 2008. Specificity of *RCN*1-mediated protein phosphatase 2A regulation in meristem organization and stress response in roots [J]. Plant physiology, 146(2): 539.

BOWMAN JL, ARTEAGA-VAZQUEZ M, BERGER F, et al., 2022. The renaissance and enlightenment of *Marchantia* as a model system [J]. The Plant Cell, 34(10): 3512-3542.

BOWMAN JL, KOHCHI T, YAMATO KT, et al., 2017. Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome [J]. Cell, 171(2): 287-304.

CHEN J, HU RB, ZHU YF, et al., 2014. Arabidopsis PHOSPHOTYROSYL PHOSPHATASE ACTIVATOR is essential for PROTEIN PHOSPHATASE 2A holoenzyme assembly and plays important roles in hormone signaling, salt stress response, and plant development [J]. Plant Physiology, 166(3): 1519-1534.

CHEN XR, HUANG SX, ZHANG Y, et al., 2018. Expression profile and cloning of genes encoding PP2A subunits of Nicotiana benthamiana [J]. Plant Physiology Journal, 54(6): 1073-1084. [陈孝仁，黄沈鑫，张烨，等，2018. 本氏烟 PP2A 亚基基因的表达模式和克隆 [J]. 植物生理学报，54(6): 1073-1084.]

DERUÈRE J, JACKSON K, GARBERS C, et al., 1999. The *RCN*1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity *in vivo* [J]. The Plant Journal, 20(4): 389-399.

FARKAS I, DOMBRADI V, MISKEI M, et al., 2007. *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases [J]. Trends in Plant Science, 12(4): 169-176.

GARBERS C, DELONG A, DERUERE J, et al., 1996. A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis* [J]. The EMBO journal, 15(9): 2115-2124.

GONZÁLEZ-GARCÍA MP, RODRÍGUEZ D, NICOLAS C, et al., 2006. A protein phosphatase 2A from *Fagus sylvatica* is regulated by GA3 and okadaic acid in seeds and related to the transition from dormancy to germination [J]. Physiologia Plantarum, 128(1): 153-162.

HEIDARI B, NEMIE-FEYISSA D, KANGASJÄRVI S, et al., 2013. Antagonistic regulation of flowering time through distinct regulatory subunits of protein phosphatase 2A [J]. PLoS ONE, 8(7): e67987.

HUO JY, LI J, XIN YF, et al., 2019. Progress on the application of CRISPR/Cas9 system in the functional study of plant genes [J]. Plant Physiology Journal, 55(3): 241-246. [霍晋彦，李姣，荆雅峰，等，2019. CRISPR/Cas9 系统在植物基因功能研究中的应用进展 [J]. 植物生理学报，55(3)：241-246.]

ISHIZAKI K, NISHIHAMA R, YAMATO KT, et al., 2016. Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research [J]. Plant and Cell Physiology, 57(2): 262-270.

KOHCHI T, YAMATO KT, ISHIZAKI K, et al., 2021. Development and molecular genetics of *Marchantia polymorpha* [J]. Annual review of plant biology, 72(1): 677-702.

KUBOTA A, ISHIZAKI K, HOSAKA M, et al., 2013. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 77(1): 167-172.

LILLO C, KATAYA ARA, HEIDARI B, et al., 2014. Protein phosphatases PP2A, PP4 and PP6: mediators and regulators in development and responses to environmental cues [J]. Plant, Cell & Environment, 37(12): 2631-2648.

MA YX, LIU YG, 2015. CRISPR/Cas9-based genome editing systems and the analysis oftargeted genome mutations in plants [J]. Hereditas, 38(2): 118-125. [马兴亮，刘耀光，2015. 植物 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统与突变分析 [J]. 遗传，38(2)：118-125.]

MICHNIEWICZ M, ZAGO MK, ABAS L, et al., 2007. Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux [J]. Cell, 130(6): 1044-1056.

MORITA K, HE S, NOWAK R P, et al., 2020. Allosteric activators of protein phosphatase 2a display broad antitumor activity mediated by dephosphorylation of *MYBL*2 [J]. Cell, 181(3): 702-715.

NARAMOTO S, HATA Y, FUJITA T, et al., 2022. The bryophytes *Physcomitrium patens* and *Marchantia polymorpha* as

model systems for studying evolutionary cell and developmental biology in plants [J]. The Plant Cell, 34(1): 228-246.
NADER CP, CIDEM A, VERRILLS NM, et al., 2019. Protein phosphatase 2A (PP2A): a key phosphatase in the progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to lung cancer [J]. Respiratory Research, 20: 1-18.
PUNZO P, RUGGIERO A, POSSENTI M, et al., 2018. The PP2A-interactor TIP 41 modulates ABA responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 94(6): 991-1009.
SANDLER G, AGRAWAL AF, WRIGHT SI, 2023. Population genomics of the facultatively sexual liverwort *Marchantia polymorpha* [J]. Genome Biology and Evolution, 15(11): evad196.
SESHACHARYULU P, PANDEY P, DATTA K, et al., 2013. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer [J]. Cancer letters, 335(1): 9-18.
SUGANO SS, NISHIHAMA R, SHIRAKAWA M, et al., 2018. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha* [J]. PLoS ONE, 13(10): e0205117.
TAN S, ABAS M, VERSTRAETEN I, et al., 2020. Salicylic acid targets protein phosphatase 2A to attenuate growth in plants [J]. Current Biology, 30(3): 381-395.
TANG W, YUAN M, WANG R, et al., 2011. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1 [J]. Nature Cell Biology, 13(2): 124-131.
TSENG TS, BRIGGS WR, 2010. The *Arabidopsis rcn*1-1 mutation impairs dephosphorylation of Phot2, resulting in enhanced blue light responses [J]. The Plant Cell, 22(2): 392-402.
TSUBOYAMA S, KODAMA Y, 2018. AgarTrap protocols on your benchtop: simple methods for Agrobacterium-mediated genetic transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* [J]. Plant Biotechnology, 35(2): 93-99.
VIRSHUP DM, 2000. Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes [J]. Current opinion in cell biology, 12(2): 180-185.
WANG J, PEI L, JIN Z, et al., 2017. Overexpression of the protein phosphatase 2A regulatory subunit a gene *ZmPP*2*AA*1 improves low phosphate tolerance by remodeling the root system architecture of maize [J]. PLoS ONE, 12(4): e0176538.
ZENG XY, HOU XW, 2015. Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in functional genomics and improvement of Plants [J]. Plant Physiology Journal, 51(9): 1351. [曾秀英，侯学文，2015. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在植物基因功能研究及植物改良中的应用 [J]. 植物生理学报，51(9)：1351.]
ZHAO JL, ZHANG LQ, LIU N, et al., 2019. Mutual regulation of receptor-like kinase SIT1 and B'κ-PP2A shapes the early response of rice to salt stress [J]. The Plant Cell, 31(9): 2131-2151.
ZHENG H, QI Y, HU S, et al., 2020. Identification of Integrator-PP2A complex (INTAC), an RNA polymerase II phosphatase[J]. Science, 370(6520): eabb5872.
ZHU X, SHEN G, WIJEWARDENE I, et al., 2021. The B’ζ subunit of protein phosphatase 2A negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 169: 81-91.